ARVO X / WorkOut 2.5

簡易取扱説明書

目次

吸光度・蛍光測定 と ELISA の定量演算

ARVO 本体と PC/ソフトウェアの起動----------3

Workout の新規プロトコール作成 ----------3～14
- A.測定波長の設定----------3
- B.ﾌﾟﾚｰﾄﾚｲｱｳﾄの設定----------6
- C.ｽﾀﾝﾀﾞｰﾄﾞ濃度設定等の解析内容の設定----------9
- D.既存(外部)検量線を用いた定量演算解析----------12

WorkOut のプロトコールの選択・実行----------15

解析結果の閲覧・編集・出力----------17

ARVO 本体と PC/ソフトウェアの終了----------22

発光測定によるルシフェラーゼアッセイ

ARVO 本体と PC / ソフトウェアの起動----------23

ルシフェラーゼアッセイ用プロトコールの作成----------23

ディスペンサーの送液ライン洗浄と試薬の充填----------30

ルシフェラーゼアッセイの実行----------31

測定データの取得----------33

試薬の回収とディスペンサーの送液ライン洗浄----------34

ARVO 本体と PC / ソフトウェアの終了----------35

フィルター搭載リスト

吸光度・蛍光励起用フィルター

	フィルターの用途		フィルターホイール	搭載ポジション	備考
	吸光度	蛍光強度			
260 nm	○	NA	内蔵	NA	UV透過性プレートが必要
280 nm	○	NA	内蔵	NA	UV透過性プレートが必要
340 nm	○	○	B2	1	吸光度の場合、UV透過性プレートが望ましい 蛍光ではFura2による細胞内Ca2+濃度測定の励起に使用→Em510nm
355 nm	NA	○	B2	3	Umbelliferone, Hoechst 33258, DAPI等の励起に使用→Em460nm
380 nm	○	○	B2	2	Fura2による細胞内Ca2+濃度測定の励起に使用→Em510nm MCA標識ペプチドを使ったプロテアーゼアッセイの励起に使用→Em460nm
405 nm	○	○	A	1	
450 nm	○	○	A	2	
485 nm	NA	○	B2	4	Fluorescein, FITC, GFP等の励起に使用→Em535nm
490 nm	○	○	A	3	
520 nm	○	○	B2	5	DihydroEthidium等の励起に使用→Em610nm EtBr等の励起に使用→Em620nm
530 nm	○	○	B2	6	Propidium Iodide (PI) の励起に使用→Em620nm
544 nm	NA	○	B2	7	TAMRA, Resorufin, Alamarblue等の励起に使用→Em590nm
555 nm	NA	○	B2	8	Alexa594等の励起に使用→Em632nm 蛍光偏光測定用フィルターとしても使用可能
570 nm	○	○	A	4	
590 nm	○	○	A	5	
600 nm	○	○	A	6	
630 nm	○	○	A	7	
660 nm	○	○	A	8	

蛍光測定用フィルター

	フィルターの用途		フィルタースライド	搭載ポジション	備考
	蛍光強度	その他			
460 nm	○	NA	A	6	Umbelliferone, Hoechst 33258, DAPI等の測定に使用→Ex355nm MCA標識ペプチドを使ったプロテアーゼアッセイの測定に使用→Ex380nm
510 nm	○	NA	A	4	Fura2による細胞内Ca2+濃度測定の測定に使用→Ex340nm, 380nm
535 nm	○	NA	A	5	Fluorescein, FITC, GFP等の測定に使用→Ex485nm
590 nm	○	NA	A	3	TAMRA, Resorufin, Alamarblue等の測定に使用→Ex544nm
610 nm	○	NA	A	2	DihydroEthidium等の測定に使用→Ex520nm
615 nm	○	○	B	2	時間分解蛍光測定用（Eu）
620 nm	○	NA	A	1	EtBr等の測定に使用→Ex520nm Propidium Iodide (PI) の測定に使用→Ex530nm
632 nm	○	○	A	8	Alexa594等の測定に使用→Ex555nm 蛍光偏光測定用フィルターとしても使用可能
642 nm	○	○	B	1	時間分解蛍光測定用（Sm）

ARVO X / WorkOut 2.5 簡易取扱説明書

吸光度・蛍光測定 と ELISA の定量演算 クイックリファレンス

① ARVO 本体と PC/ソフトウェアの起動

ARVO 本体の電源を入れる際には、分注装置右側背面にある電源スイッチを On にしてください。
（ARVO 本体背面の電源スイッチには触らずに、常時 On にしておいて下さい。）

本体の起動後、コントロール用 PC の電源を入れてください。
PC 起動後、Workout のアイコンをダブルクリックし、ソフトウェアを起動してください。
WorkOut の起動が終了すると、以下のウィンドウが現れます。

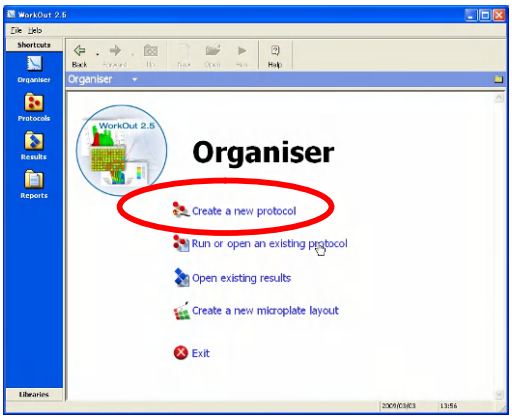
② Workout の新規プロトコール作成

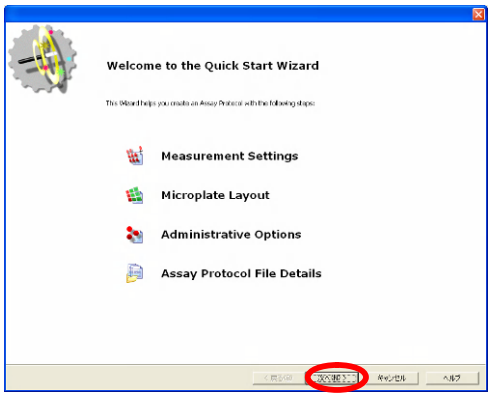
すでに測定プロトコールが設定されている場合は、P.15 の『③WorkOut のプロトコールの選択・実行』へ進んでください。

WorkOut では、
【A.測定波長の設定】→【B.プレートレイアウトの設定】→【C.スタンダード濃度設定等の解析内容の設定】
…の順序でプロトコールを組んでいきます。

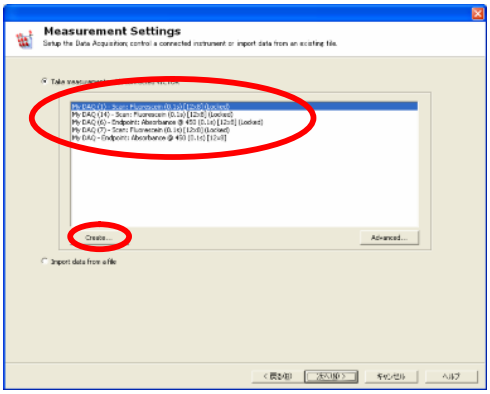
A.測定波長の設定

“Create a new protocol”をクリックすると“Welcome to the Quick Start Wizard”ウィンドウが現れるので、“Next >”をクリックして先に進んでください。

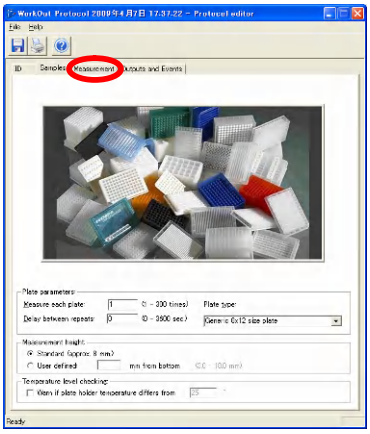




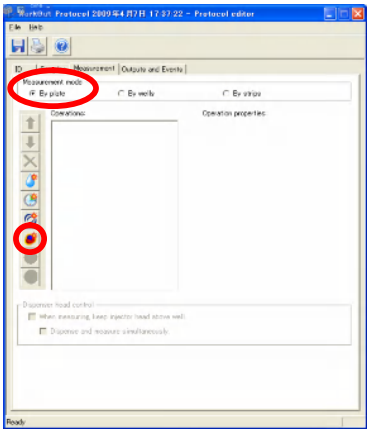
次ページにあるような“Measurement Settings”の選択・設定画面が現れますので、過去に WorkOut での使用歴のあるサンプルの測定方法をリストから選択するか、あるいは“Create…”をクリックして、新しく測定方法の設定を行います。ここでは新しく測定方法を設定する方法について説明します。



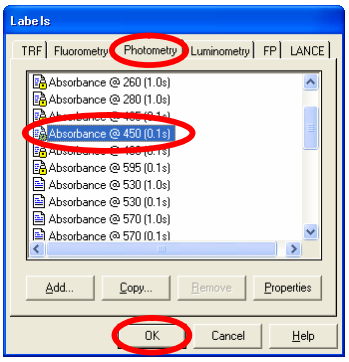
“Protocol editor”ウィンドウが現れますので、“Measurement”タブをクリックしてください。



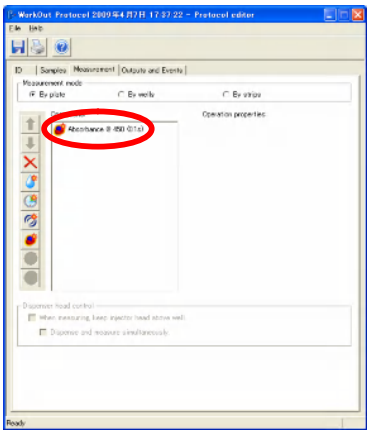
測定プロトコールは、測定に使用する波長や測定時間についての設定(Label)を Operations に並べて構成します。ここでは主波長として 450nm(各ウェル 0.1 秒)の吸光度、副波長として 630nm(各ウェル 0.1 秒)の吸光度を測定する場合を例に、プロトコールを作成します。初めに“Measurement mode:”が“By Plate”になっていることを確認し、次いで Label のアイコン をクリックします。



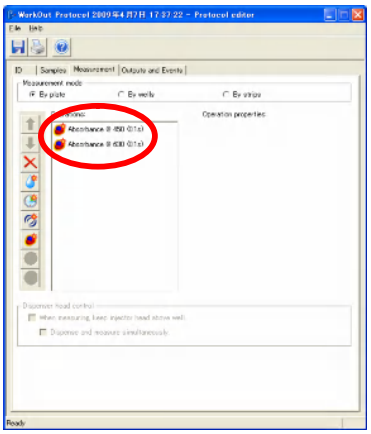
“Labels”ウィンドウが現れますので、吸光度測定の場合は“Photometry”タブを選び（蛍光測定の場合は“Fluorometry”を選択）、その中にある“Absorbance@450(0.1s)”を選択し、“OK”をクリックしてください。



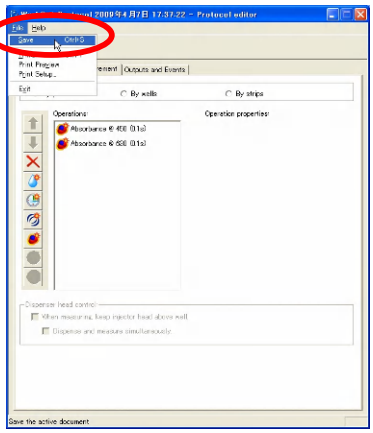
Operations に“Absorbance@450(0.1s)”が記入され、450nm で各ウェル 0.1 秒の吸光度測定を行うことが設定されたことが確認できます。



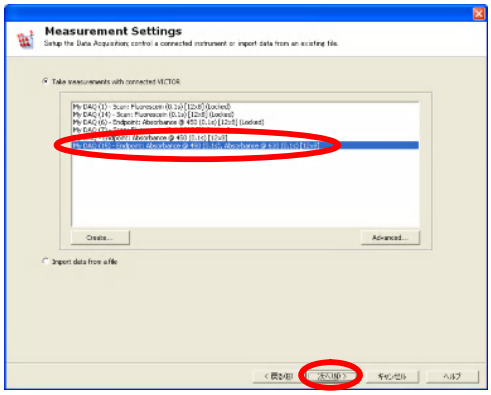
前述の手順を繰り返し、今度は“Absorbance@630(0.1s)”を選択・設定すると、以下のように 450nm で各ウェル 0.1 秒の吸光度測定に続いて、630nm で各ウェル 0.1 秒の吸光度測定を行うことが設定されたことが分かります。



最後に File メニューから Save を選んでこの設定を保存し、“Protocol editor”を閉じてください。

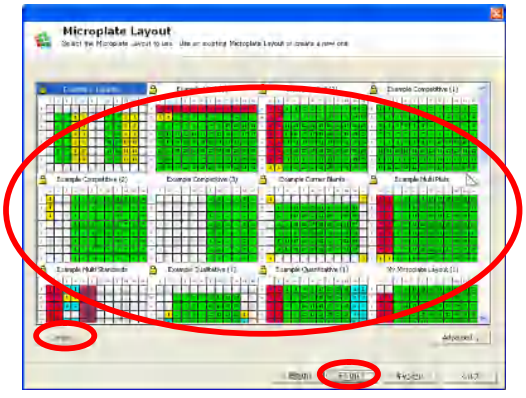


“Measurement Settings”のリストに設定した内容が追加されますので、それが選択された状態で“Next >”をクリックしてください。

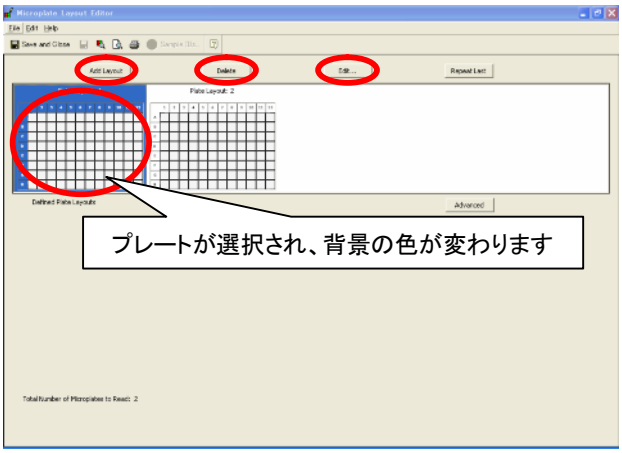


B.プレートレイアウトの設定

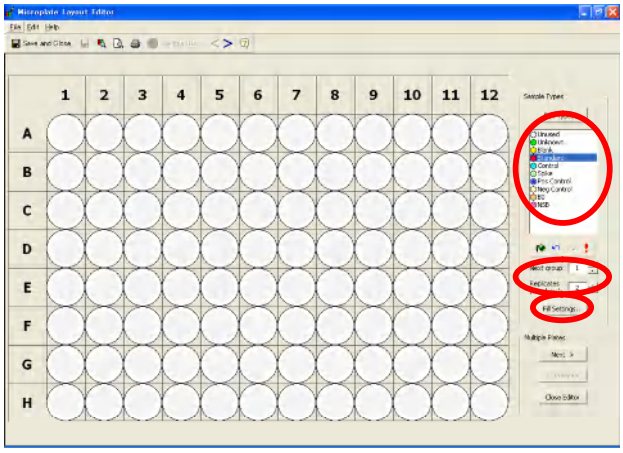
“Microplate Layout”ウィンドウが表示されますので、既存のプレートレイアウトの中から使いたいものを選択して“Next >”をクリックするか（指定したレイアウトをダブルクリックして、内容確認することができます）、あるいは新しいプレートレイアウトの設定を行います。ここでは“Create…”をクリックして、新しくプレートレイアウトを設定する方法について説明します。



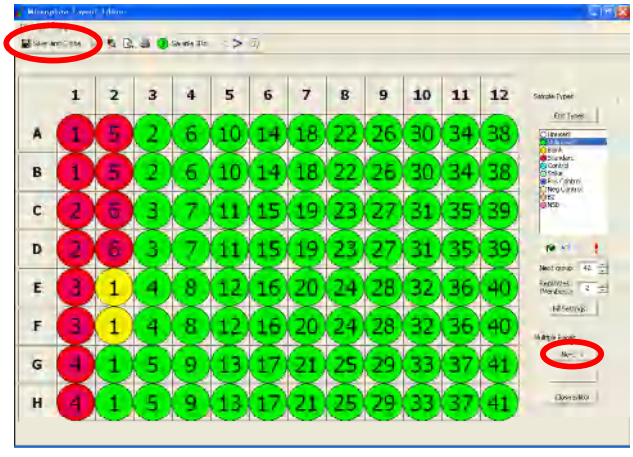
“Microplate Layout Editor”ウィンドウが表示されますので、“Add Layout”をクリックしてプレートの枚数を設定してください（減らすときは“Delete”をクリック）。レイアウト詳細を設定するプレートを選び（背景の色が変わります）“Edit...”をクリックすると、次の画面に移行します。



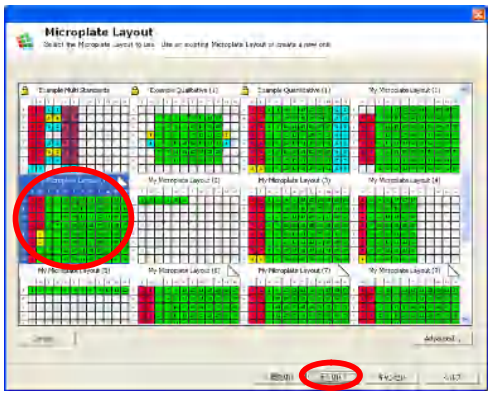
この画面でプレートマップを作成します。ウィンドウ右側のリストからウェルのタイプを選択し、左側のプレートマップを作成します。その際、リストの下にある“Next group”（次に振られる番号）と“Replicates”（同じ数字を振るウェルの個数）、“Fill Settings...”（数字がどのようルールに従って振られるかを定義）の内容に気をつけ、プレートマップを埋めてください。



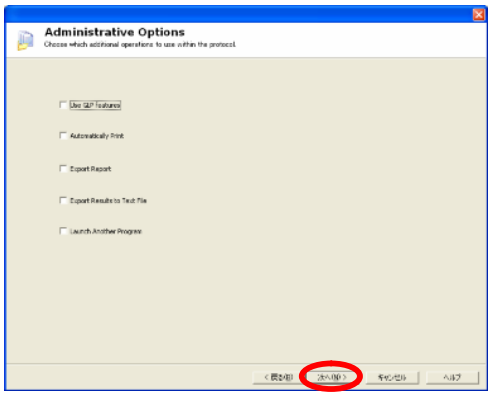
下図の例の様にプレートマップ作成を終えたら、2枚目以降のプレートマップの作製する場合には、ウィンドウ右下の“Next >”をクリックして2枚目以降のプレートのプレートマップ作製を行います。この場合、各ウェルの数字（多くの場合「Unknow」）は再度「1」から振り直しになります。プレートマップ作成を終了する場合には“Save and Close”のアイコン Save and Close をクリックして、この設定を保存してください。



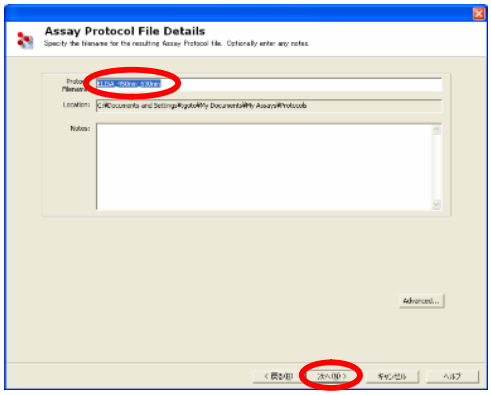
“Microplate Layout”には作成したプレートマップが選択されていますので、“Next >”をクリックします。



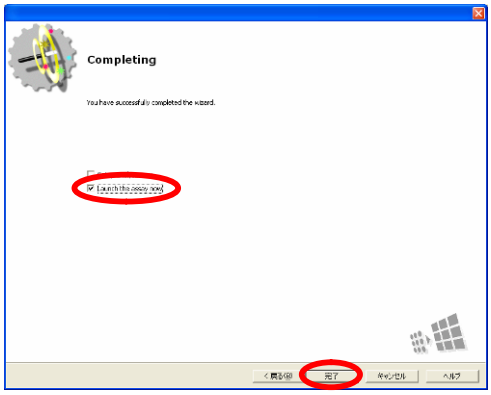
“Administrative Options”では、何も指定せずに“Next >”をクリックして次へ進んでください。



“Assay Protocol File Details”では、作成したプロトコールに名前を付け、“Next >”をクリックしてください。

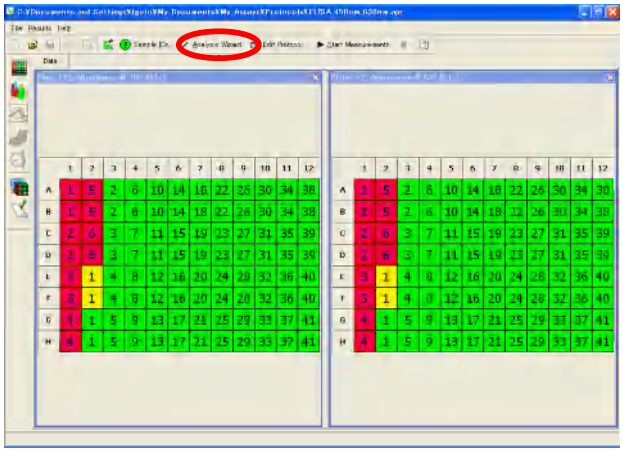


“Completing”では“Launch the assay now”がチェックされていることを確認し、“Finish”をクリックします。

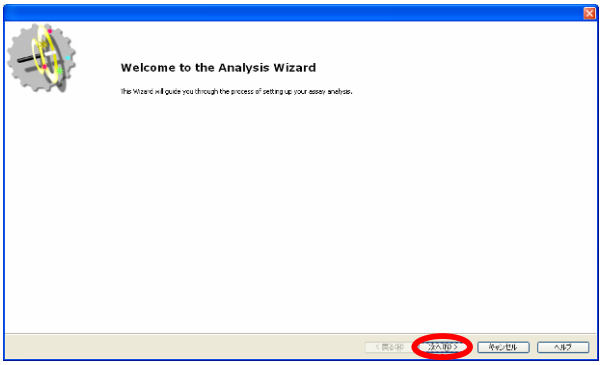


C. スタンダード濃度設定等の解析内容の設定

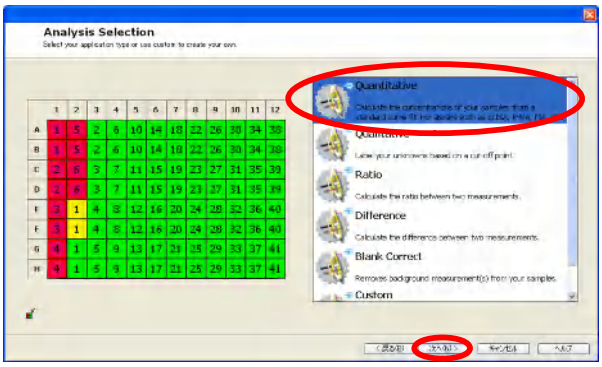
作成したプロトコールが自動的に開きますが、スタンダードの濃度など解析に必要な情報を設定するために、“Analysis Wizard”のアイコンを Analysis Wizard クリックしてください。



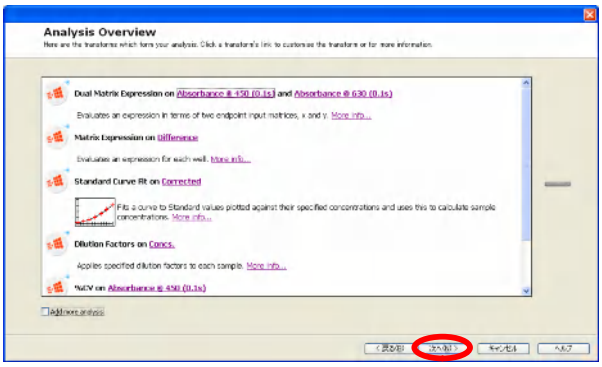
“Welcome to the Analysis Wizard”が開きますので、“Next >”をクリックして次へ進みます。



“Analysis Selection”の項目が開きますので、検量線を使用した定量演算（ELISA 等）を行う場合には、“Quantitative”を選択し（背景の色が変わります）、“Next >”をクリックして次へ進みます。

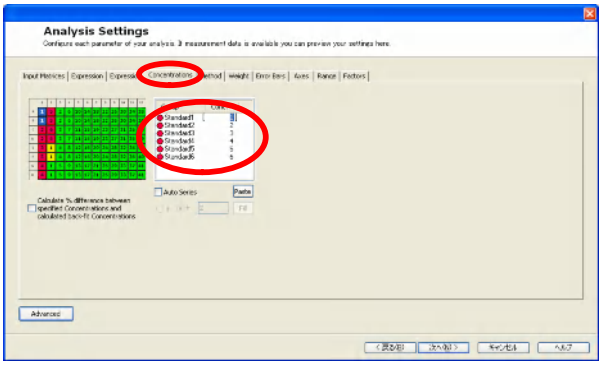


“Analysis Overview”として解析をおこなう内容が列記されます。“Next >”をクリックして次へ進みます。

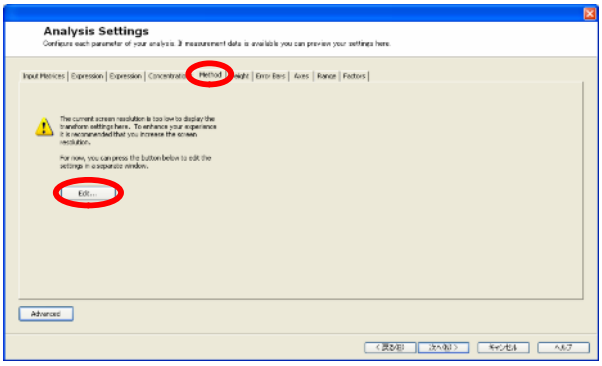


“Analysis Setting”の項目では、必要な内容をカスタマイズします。

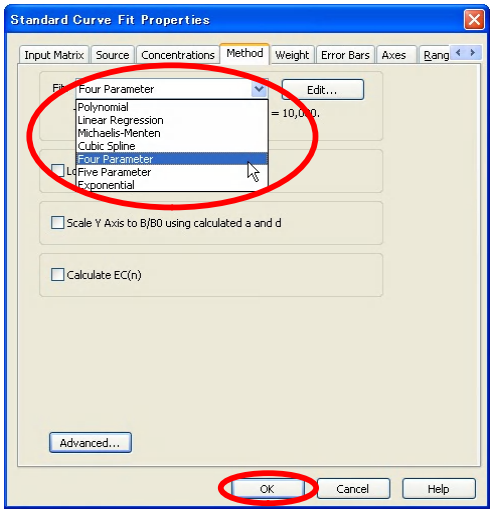
まず“Concentrations”のタブをクリックし、設定した各スタンダードの濃度を入力します。この設定は、サンプルの測定後に変更・再解析することも可能です。



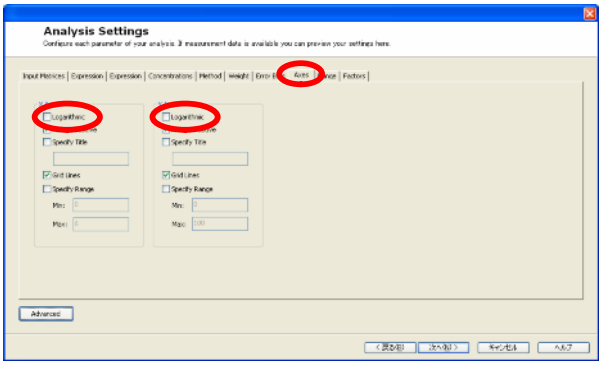
“Method”では、スタンダードカーブ（検量線）を描く方法を選択いただけます。デフォルト設定は最小二乗法による直線回帰ですので、それ以外の方法でスタンダードカーブを描く場合にのみ設定してください。設定を行う場合は“Edit…”をクリックします。



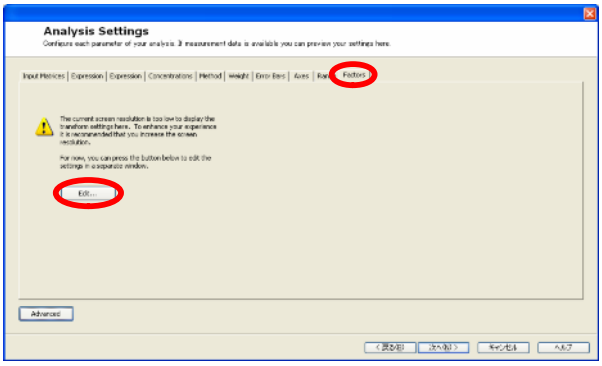
“Standard Curve Fit Properties”が開きますので、ここでスタンダードカーブの描き方として適当なものを選択してください。一般的には、直線回帰は Linear Regression、高次曲線として描く場合は Polynomial（別途次数も設定します）、各点を曲線で滑らかに結ぶ場合は Cubic Spline、シグモイド状（S 字状）の曲線を描く場合は Four Parameter、あるいは Five Parameter を使用します。設定を終えたら OK をクリックします。



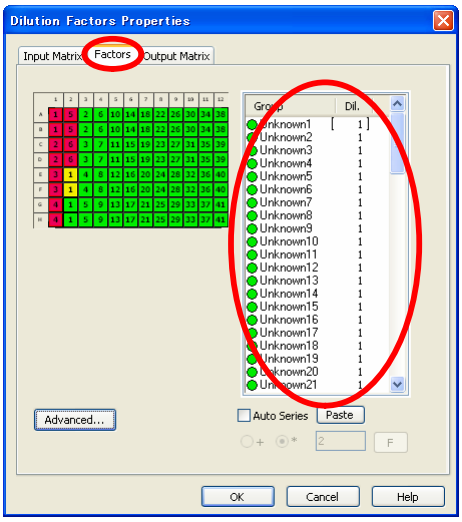
“Axes”では、スタンダードカーブ（検量線）を表示する際にその X 軸・Y 軸のそれぞれを対数軸に変更することができます。対数に変更する必要がない場合は、変更する必要はありません。対数軸に変更する場合は、それぞれチェックボックスにチェックを入れてください。



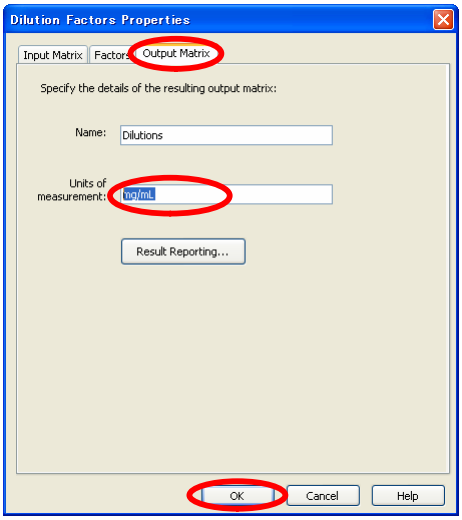
“Factors”では、各 Unknown のサンプルの希釈倍率（アッセイ時にサンプルの希釈を行っていなければ1倍と設定、この設定により解析結果においては原液の濃度に戻って定量結果がレポートされます）と、その際の単位を設定します。“Edit…”をクリックします。



“Dilution Factor Properties”が開きます。まず“Factors”のタブで、希釈倍率を入力します。サンプルの希釈を行っていない場合は、デフォルト値の「1」のままで構いません。

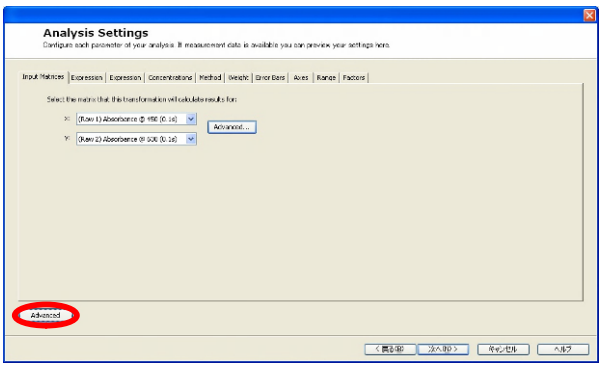


次に“Output Matrix”のタブに移り、最終的に出力される検体濃度の単位を入力します。設定を終えたらOK をクリックします。

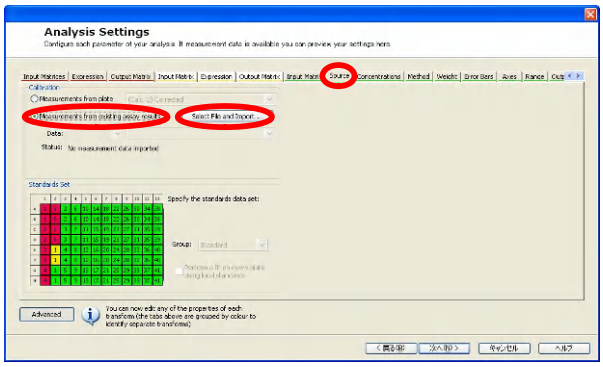


D. 既存（外部）検量線を用いた定量演算解析

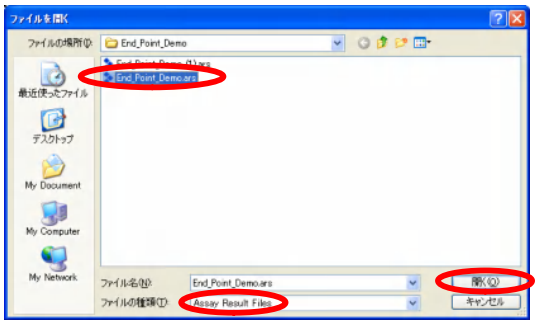
アッセイ方法によっては、かつて同様のアッセイを行った際の検量線を適用して定量演算を行うことがありますが、その場合は“Analysis Setting”の項目の左下にある“Advanced”をクリックしてください。



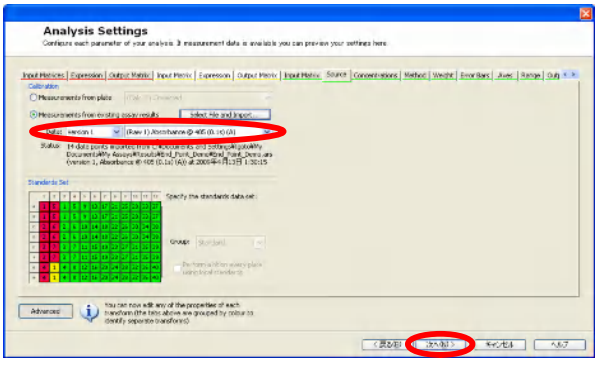
“Source”のタブをクリックし、“Measurements from existing assay results”を選択し、“Select File and Import…”をクリックしてください。



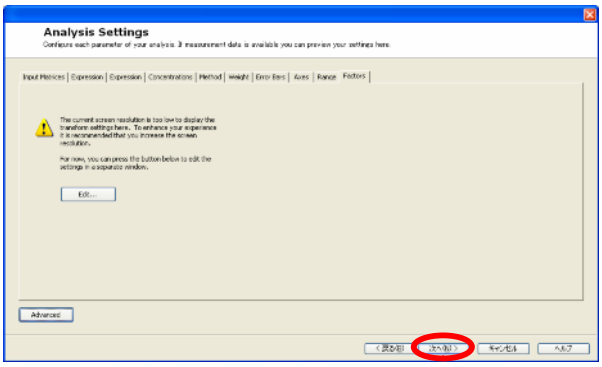
参照する WorkOut の Result File を開きます。通常は C ドライブの My Document の中にある My Assays フォルダ内の Results フォルダの中に Result File を収納したアッセイプロトコール名のフォルダがありますので、その中から該当するファイル（.ars という拡張子のファイル）を選択し、“Open”をクリックしてください。



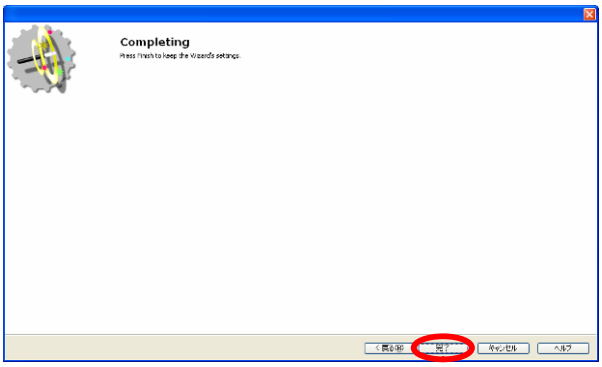
検量線を参照する Result File が指定されますので、それ確認してください。



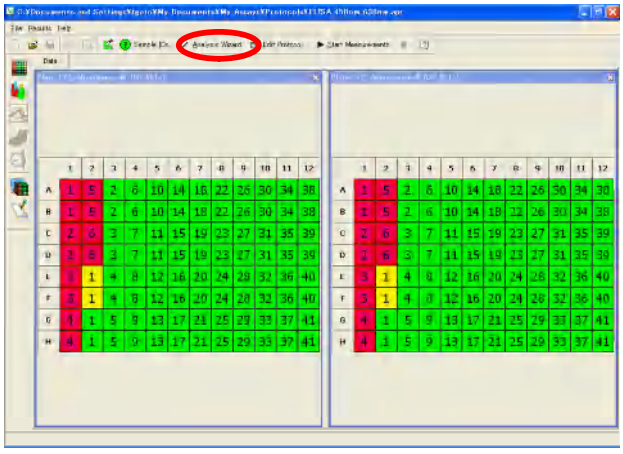
全ての設定を終えたら、“Next >”をクリックして次へ進みます。



“Completing”の画面で設定は終了です。“Finish”をクリックしてください。



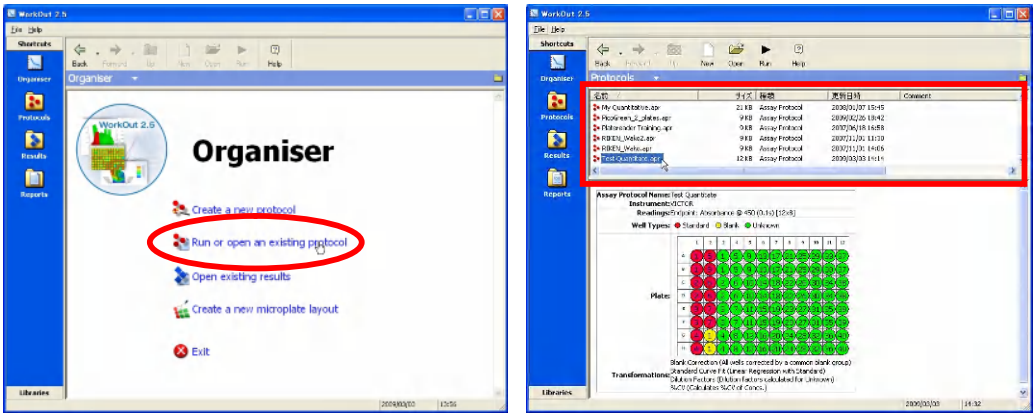
“Analysis Wizard”を動かす前の画面に戻りますが、ここで必ず Save のアイコン をクリックして、今の設定を保存するようにしてください。



以上で新規のプロトコール作成は終了です。

③ WorkOut のプロトコールの選択・実行

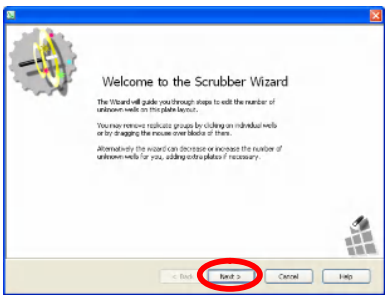
“Run or open an existing protocols”をクリックし、プロトコールリストから目的のプロトコールをダブルクリックください。



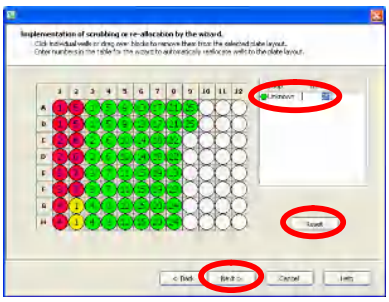
以下のようにアッセイプロトコールが開きます（赤いウェルが Standard、黄色いウェルが Blank、緑色のウェルが Unknown）。測定するサンプル数を変更する必要がなければ、サンプルプレートを ARVO にセットし、“Start Measurements”をクリックすると、自動的に測定が始まり、測定終了後に自動解析が行われます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	5	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B	1	5	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C	2	6	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D	2	6	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E	3	7	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F	3	7	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G	4	1	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H	4	1	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40

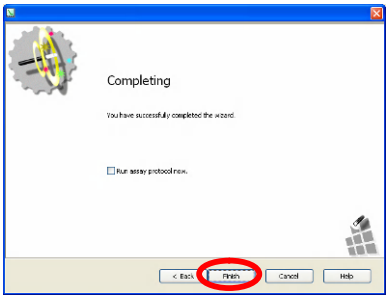
測定するサンプル数を変更したい場合には、左上の“Run Scrubber Wizard”のアイコン をクリックすると、以下のように Scrubber Wizard のウィンドウが現れますので、“Next >”をクリックしてください。



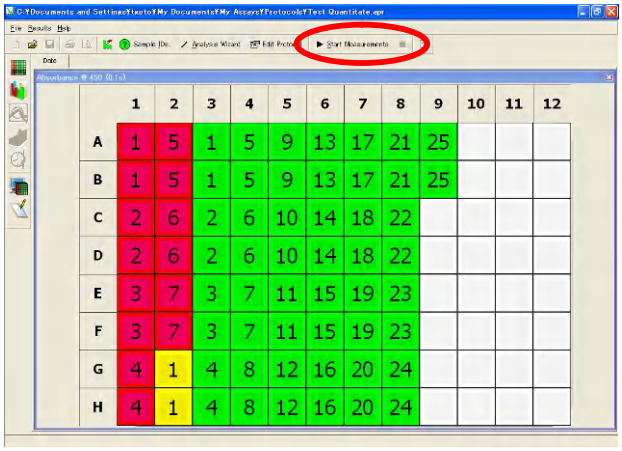
Scrubber Wizard では、マイクロプレートのレイアウトから一時的にUnknown（緑色表示のウェル）を削減することができます。削減したいウェルを直接クリック/ドラッグするか、ウィンドウ右側の表中の数字を書き換えることで、Unknown のウェル数を変更できます。また“Reset”をクリックすれば元のプレートレイアウトに戻すこともできます。Unknown のウェル数変更を終えたら、“Next >”をクリックしてください。



最後に“Finish”をクリックすれば、アッセイプロトコールのプレートマップが変更されます。

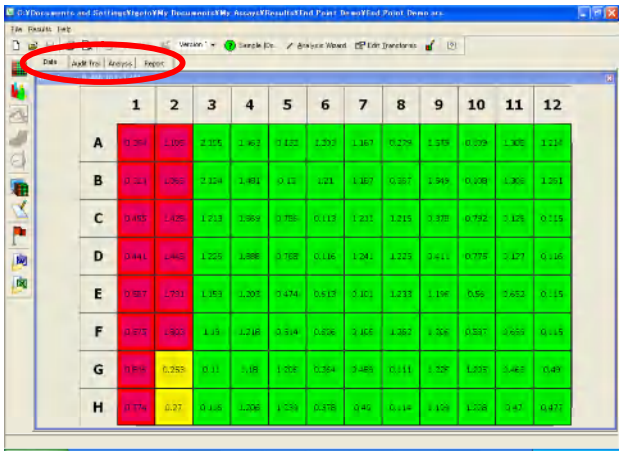


なお、この変更は一時的なものですので、保存されているアッセイプロトコールのプレートマップには変更はありません。サンプルプレートを ARVO にセットし、“Start Measurements”をクリックすると、自動的に測定が始まり、測定終了後に自動解析が行われます。



④ 解析結果の閲覧・編集・出力

サンプルの測定と自動解析が終わると、以下のように4つのタブ（Data、Audit Trail、Analysis、Report）を備えた解析結果ファイルが開きます。



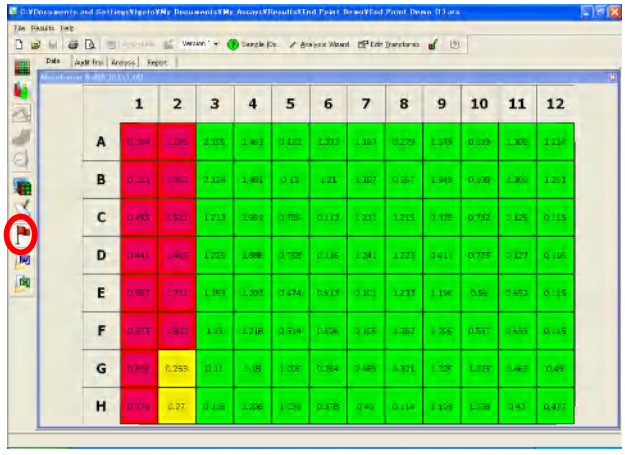
・Data ： 各ウェルの測定値や、解析の各過程での算出値が表示されます。
・Audit Trail ： 測定や解析・再解析のログが記録されます。
・Analysis ： ELISA の解析を行なった場合、スタンダードカーブ（検量線）が表示されます。
・Report ： 印刷、あるいはファイル出力の内容を表示します。

✓ 異常値を示すサンプルを除いて再解析を行なう場合

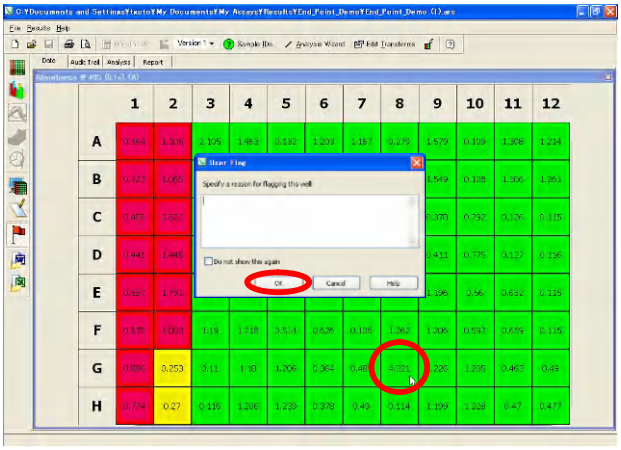
Duplicate・Triplicate で用意したサンプルの一部が他と大幅に違う値を示している場合、あるいはスタンダードカーブ作成用サンプル（Standard：赤いウェル）の一部が明らかに異常値を示している場合など、特定のサンプルを除き、再解析を行なうことが適当であると考えられる場合には、以下の手順で異常値を示すサンプルを除いてから再解析を行なってください。

【Data のタブから】

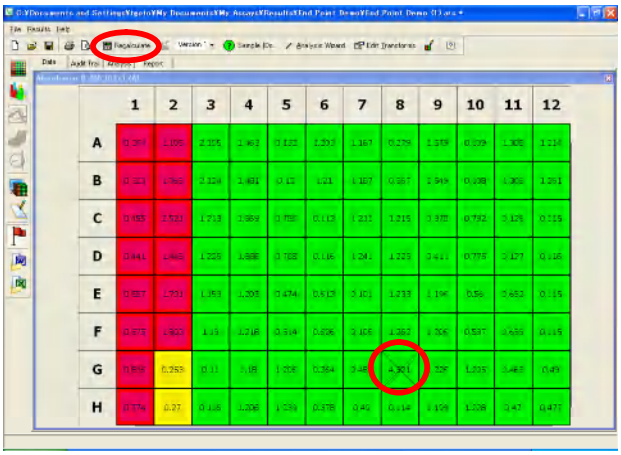
異常値を示すウェルがある場合には、画面左側の“Flag”アイコンをクリックしてオンにします。



続いて異常値を示す問題のウェルをクリックし、Flag する理由を入力するダイアログボックスの“OK”をクリックしてください。*（理由の入力は任意です）*

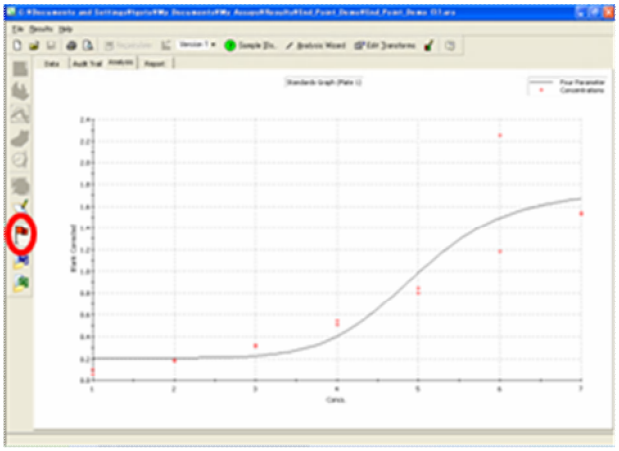


問題のウェルに × 印がつき、“Recalculate”のボタンが点滅してアクティブになります。“Recalculate”をクリックすれば、Flag したウェルを除いた状態で、再解析が始まります。

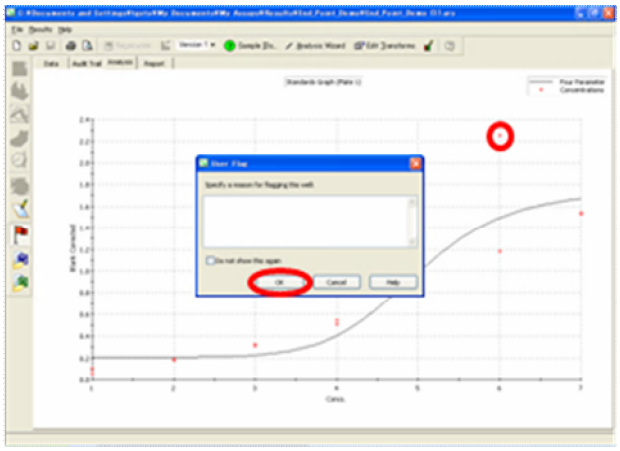


【Analysis のタブから】

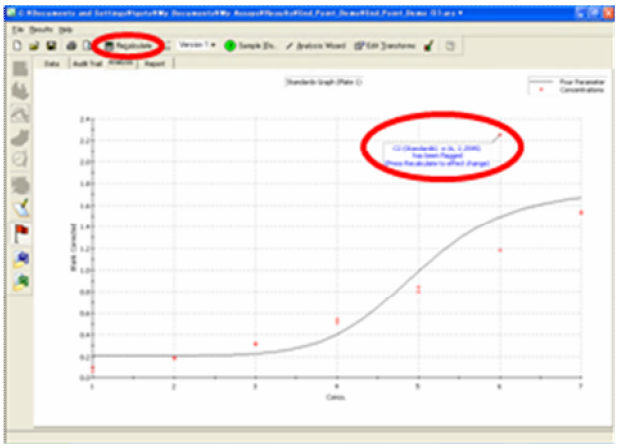
スタンダードカーブを構成するサンプル中に異常値がある場合には、画面左側の“Flag”アイコンをクリックしてオンにします。



続いて問題のサンプルをクリックし、Flag する理由を入力するダイアログボックスの“OK”をクリックしてください。*(理由の入力は任意です)*



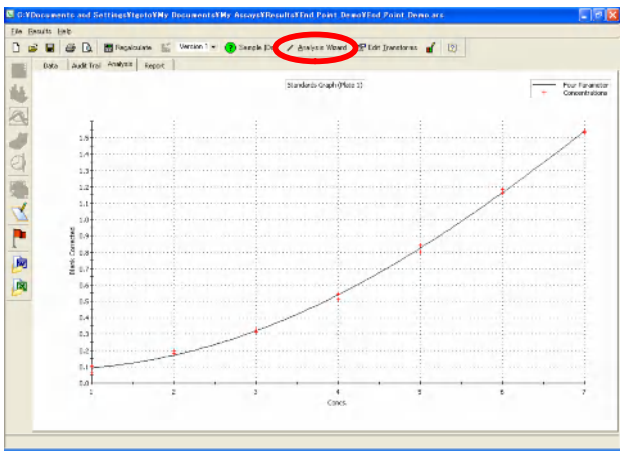
Flag したサンプルの表示が下図のように変わり、“Recalculate”のボタンが点滅してアクティブになります。“Recalculate”をクリックすれば、Flag したサンプルを除いた状態で、再解析が始まります。



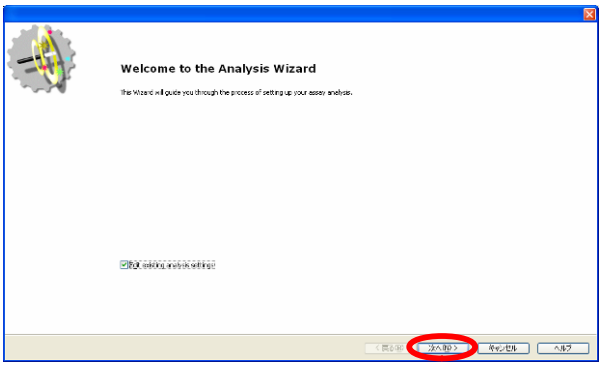
✓ 解析条件を変更して再解析を行なう場合

たとえばスタンダードの各サンプルの濃度設定を変更する場合、スタンダードカーブの作成方法を変更する場合、スタンダードカーブの X 軸・Y 軸を対数表示に変更する場合、サンプルの希釈倍率設定を変更する場合などは、以下の手順で各パラメーターを変更してから再解析を行なってください。

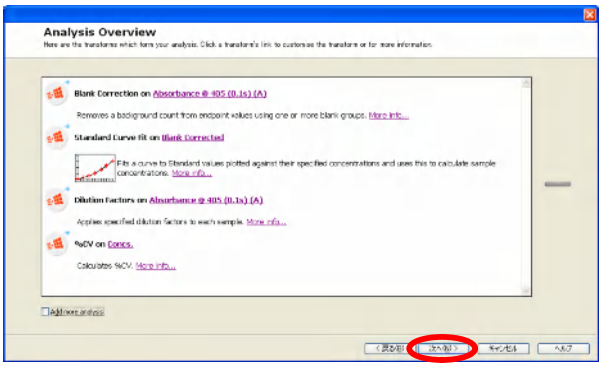
画面上部の“Analysis Wizard”をクリックします。



設定によってはこの画面が現れますので、“Next >”をクリックします。



Analysis Overview が現れますので、“Next >”をクリックします。



Analysis Setting のウィンドウが表示されたら、

① スタンダードの濃度設定を変更する場合は Concentrations のタブ

② スタンダードカーブを描く方法を変更する場合は Method のタブ

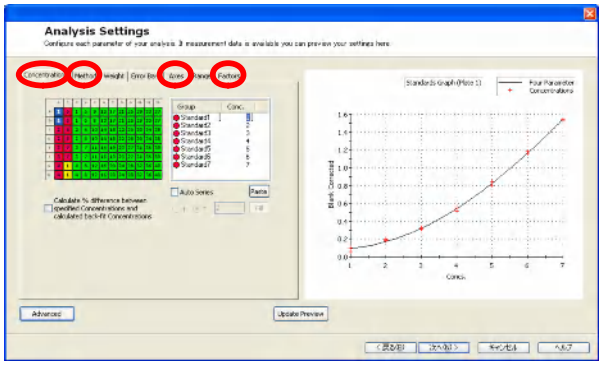
③ スタンダードカーブの X・Y 軸を対数軸に変更する、あるいは対数軸から戻す場合は Axes のタブ

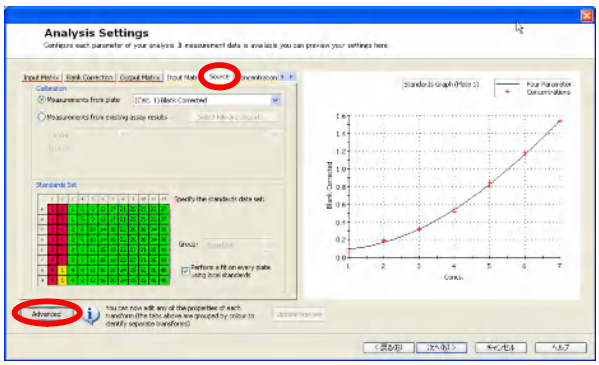
④ Unknown のサンプルの希釈倍率を変更する、および出力されるサンプル濃度の単位表示を変更する場合は Factor のタブ

…をそれぞれ選択し、必要なパラメーターの変更を行ってください。

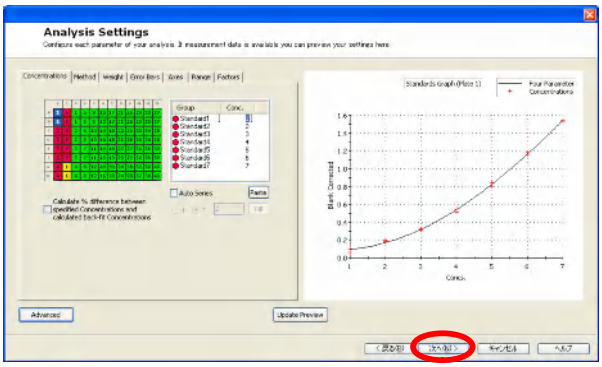
⑤ 他のアッセイの検量線を参照して解析を行う場合には“Advanced”を選択し、Source のタブを選択して、参照するアッセイのファイルを選択してください。

なお、変更方法の詳細は、この簡易取説書の P.10~14 にある記述をご参照ください。

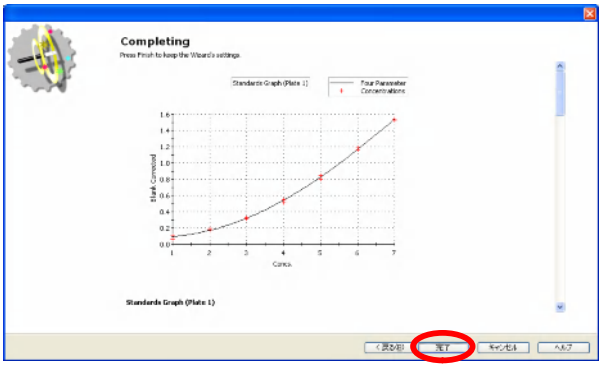




必要な項目について全パラメーターの変更を終えたら、Analysis Setting のウィンドウに戻り、“Next >”をクリックしてください。



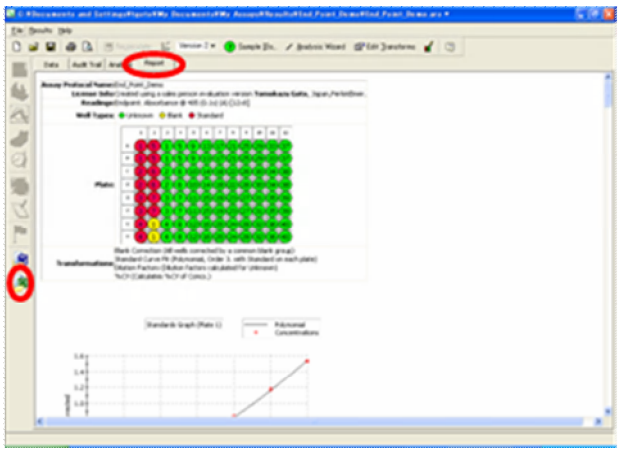
Completing のウィンドウになったら、“Finish”をクリックしてください。再解析が始まります。

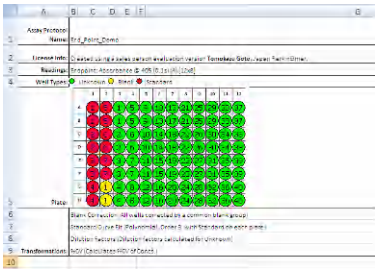


✓ 解析結果を出力する場合

Report タブを選択すると、レポート内容が表示されます。ウィンドウ左側にあるエクセルのアイコンをクリックすると、レポートがエクセルフォーマットで出力されます。*（出力には少々時間がかかります）*

出力されたエクセルファイルを保存し、適宜解析にご使用ください。





⑤ ARVO 本体と PC/ソフトウェアの終了

ARVO システムの終了は、まず PC / ソフトウェアを終了し、続いて ARVO 本体の電源を Off にします。

まずコントロール用 PC にて起動しているソフトウェアをすべて終了します。ソフトウェアの終了に際しては、この順序で終了しなければならないという順序はありません。各ウィンドウ右上の×マークをクリックして、順次ソフトウェアを終了させてください。

続いて通常の手順でコントロール用 PC を終了させてください。

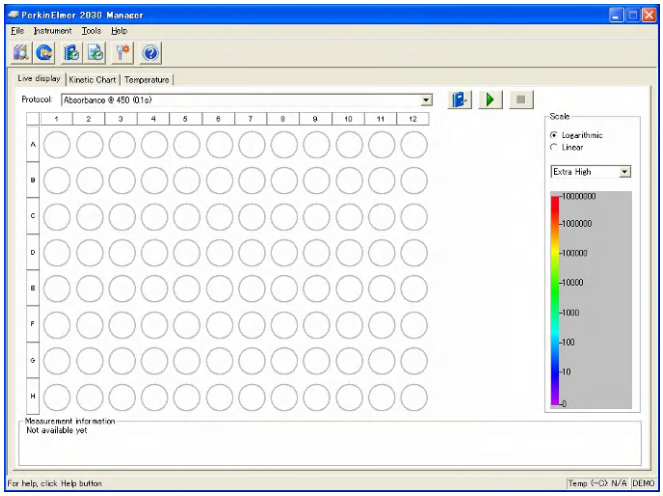
最後に ARVO の電源を切りますが、その際は分注装置右側背面にある電源スイッチを Offにしてください。
（ARVO 本体背面の電源スイッチには触らずに、常時 On にしておいて下さい。）

⑥ ARVO 本体と PC / ソフトウェアの起動

ARVO 本体の電源を入れる際には、分注装置右側背面にある電源スイッチを On にしてください。
（ARVO 本体背面の電源スイッチには触らずに、常時 On にしておいて下さい）

本体の起動後、コントロール用 PC の電源を入れてください。

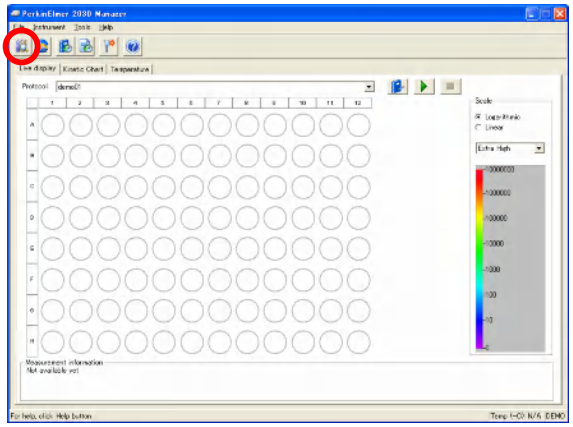
PC が起動した後に、PerkinElmer 2030 Workstation のアイコンをダブルクリックし、ソフトウェアを起動してください。PerkinElmer 2030 Workstation の起動が終了すると、以下の PerkinElmer 2030 Manager ウィンドウが現れます。

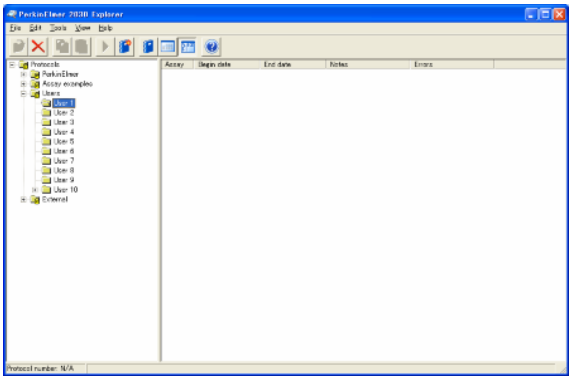


⑦ ルシフェラーゼアッセイ用プロトコールの作成

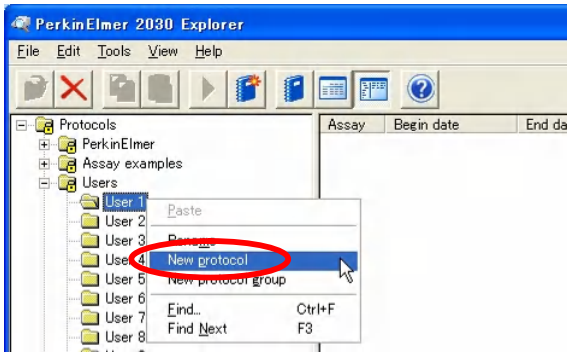
*すでにプロトコールが設定されている場合は、P.30 の『**③ディスペンサーの送液ライン洗浄と試薬の充填**』へ進んでください。*

PerkinElmer 2030 Manager ウィンドウの左上にある、“Explore protocols and results” のアイコンをクリックし、PerkinElmer 2030 Explorer ウィンドウ（右下図）を開いてください。

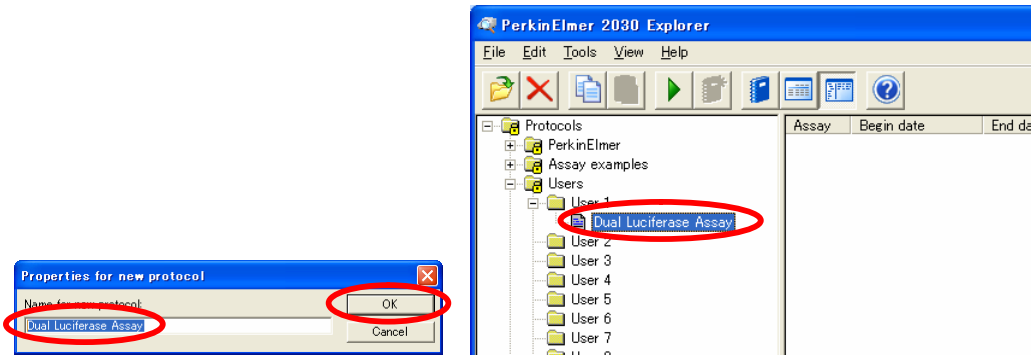




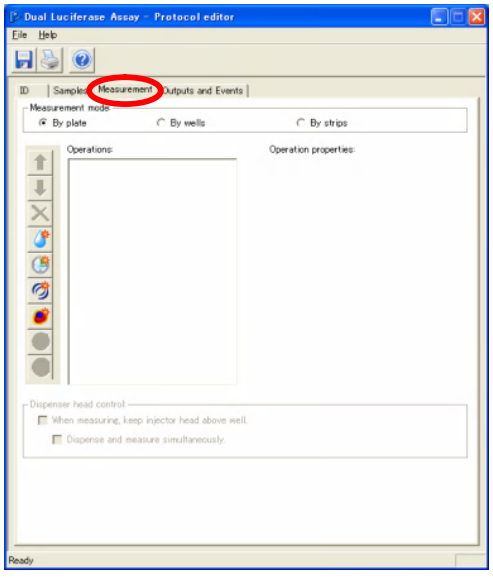
Explorer ウィンドウの左側にあるプロトコールツリーの中から新規にプロコールを作成する場所（フォルダー）を選び、マウスの右クリックでメニューを表示させ、“New protocol”を選びます。プロトコールを入れておくフォルダーは簡単に変更できるので、取り急ぎ適当なフォルダーを選択してプロトコール作成を開始しても問題はありません。



“Properties for new protocol”のダイアログボックスが現れるので、適宜プロトコール名を入力し（後で変更可能です。ここでは仮に Dual Luciferase Assay とします）、OK をクリックすると、Explorer ウィンドウ/プロトコールツリーの選択したフォルダーの下に、新しいプロトコールファイルが作成されます。



プロトコールツリー内のプロトコールファイルをダブルクリックすると、以下の様に“Protocol editor”ウィンドウが開きます。分注機での試薬分注を伴うLuciferase Assay のプロトコール（サンプルは 96 ウェルプレートを用いて準備）を作成する場合は、“Measurement”のタブで作業を行います。

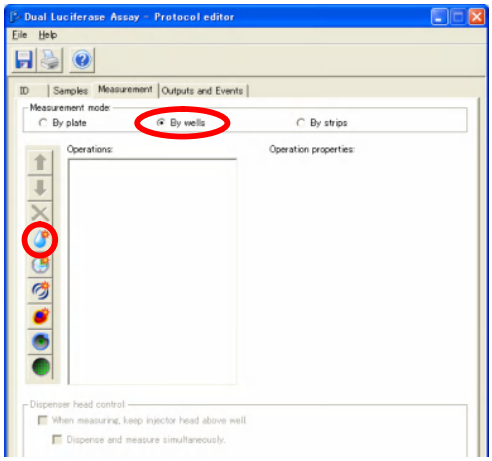


ここでは Dual Luciferase Assay 用のプロトコール例として、以下の行程のプロトコールを組むこととします。

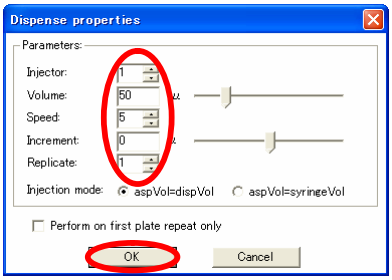
【1番のポンプから初めの試薬を 50µL 分注】
↓
【直線撹拌（振幅：3mm、時間：2 秒）】
↓
【待機（3 秒）】
↓
【発光測定（5 秒）】　*ホタルの発光測定*
↓
【2番のポンプから次の試薬を 50µL 分注】
↓
【直線撹拌（振幅：3mm、時間：2 秒）】
↓
【待機（3 秒）】
↓
【発光測定（5 秒）】　*ウミシイタケの発光測定*
↓
【隣のウェルへ移動し、1番のポンプから初めの試薬を 50µL 分注】
↓

アッセイによっては、例えばプレート撹拌や待機時間が不要だったり、発光測定の時間が異なったりすることもありますので、実際に行うプロトコールに合わせて適宜改変していただくことをお勧めします。

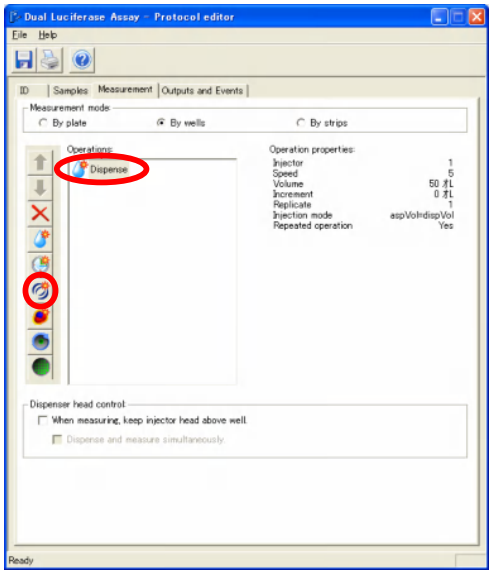
初めに Measurement mode:を、By plate から By wells に変更し、（変更時に警告のダイアログボックスが出ますが、気にせずに進めて構いません）、次に Dispense のアイコン をクリックします。



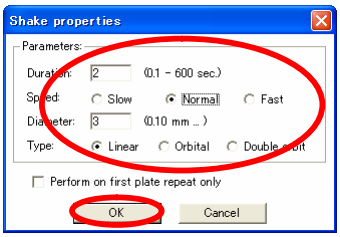
“Dispense properties”ウィンドウが現れますので、Injector は1番、Volume（分注量）は 50µL、Speed（分注速度、大きい方が速い）は 5 など、下図に従って設定を行った後で、OK をクリックしてください。



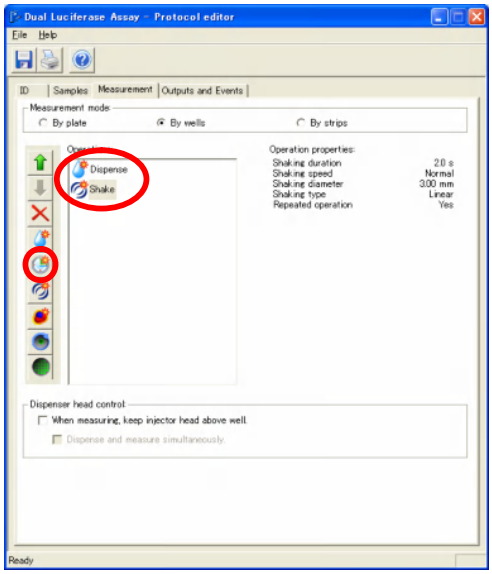
“Protocol editor”ウィンドウの Operations に Dispense が記入されたことを確認し、次に Shake のアイコン をクリックしてください。



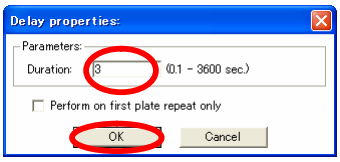
“Shake properties”ウィンドウが現れますので、Duration（撹拌時間）は 2sec.、Speed（撹拌速度）は Normal、Diameter（振幅・撹拌径）は 3mm、Type（撹拌方法）は Linear に設定した後で、OK をクリックしてください。



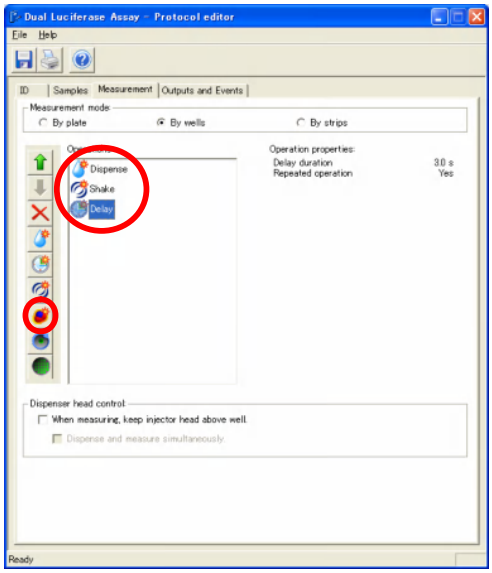
“Protocol editor”ウィンドウの Operations に Dispense につづいて Shake が記入されたことを確認し、次に Delay のアイコン をクリックしてください。



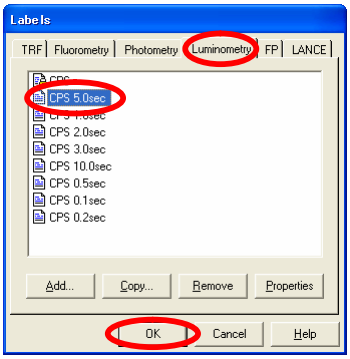
“Delay properties”ウィンドウが現れますので、Duration（待機時間）を 3sec.に設定した後で、OK をクリックしてください。



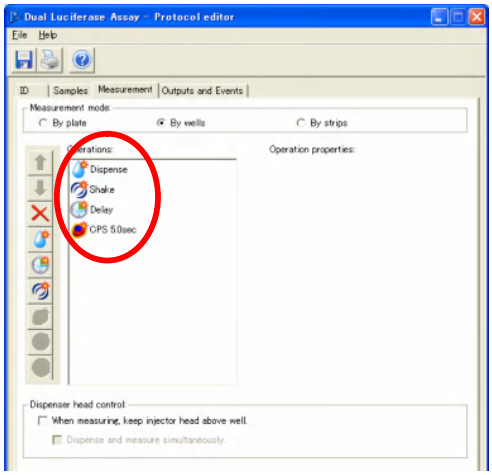
“Protocol editor”ウィンドウの Operations に Dispense、Shake につづいて Delay が記入されたことを確認し、次に Label のアイコンをクリックしてください。



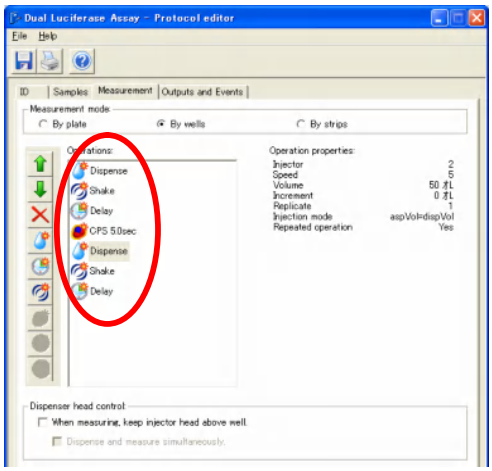
“Labels”ウィンドウが現れますので、Luminometry のタブを選択し、CPS 5.0sec（各ウェル５秒の発光測定用の設定）を選択してから OK をクリックしてください。



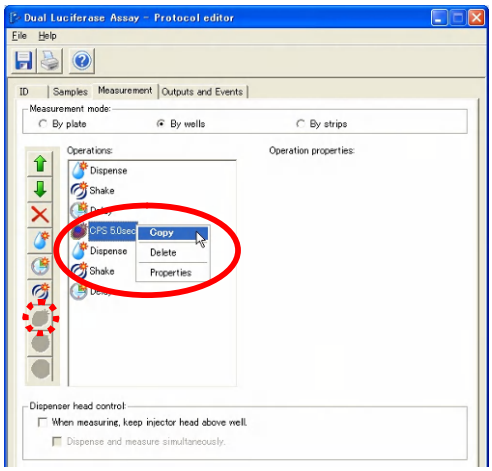
“Protocol editor”ウィンドウの Operations に Dispense、Shake、Delay に続いて CPS 5.0sec が記入されたことを確認してください。これで1回目の発光測定までの設定が終わりました。



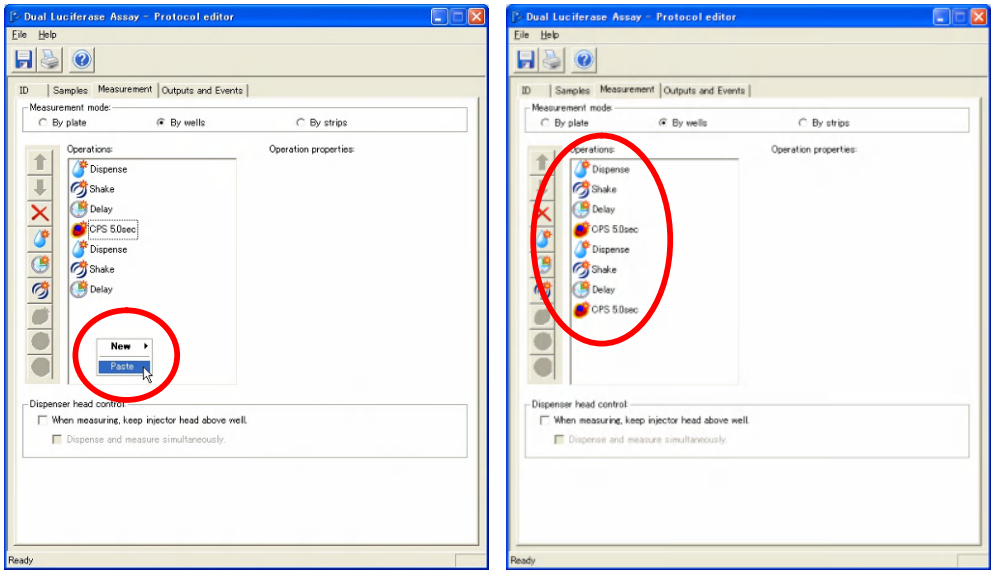
これまでの設定の手順に従って、2回目の Dispense の設定（Injector が 2 に変更になるので注意）、Shake の設定（これは1回目と同じでよい）、Delay の設定（これも1回目と同じでよい）を追加し、以下のような設定状況になっていることを確認してください。



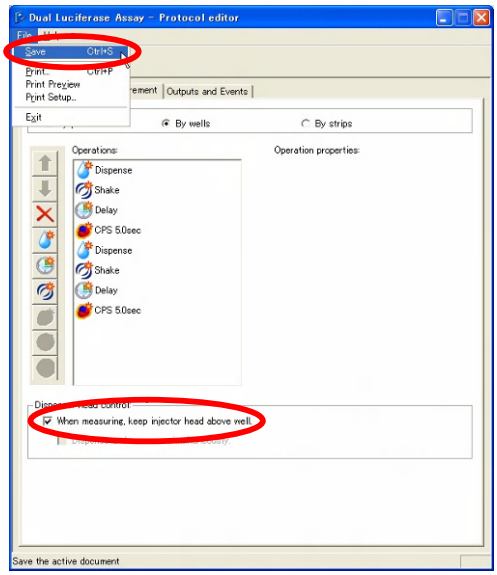
2回目の Label の設定も1回目と同様に行いたいところなのですが、残念ながらこの状態では Label のアイコンはアクティブな状態ではなく、通常の方法では選択できません。そこで、Operations に表示されている CPS 5.0sec を選択してからマウスの右クリックを使用すると、下図のようにメニューが現れますので、Copy を選択してください。



続いて Operations の白い部分をクリックした後に右クリックすると下図のようにメニューが現れますので、Paste を選択すると、2回目の CPS 5.0sec が Operations の一番下に追加されます。これで Operations の中身は完成です。

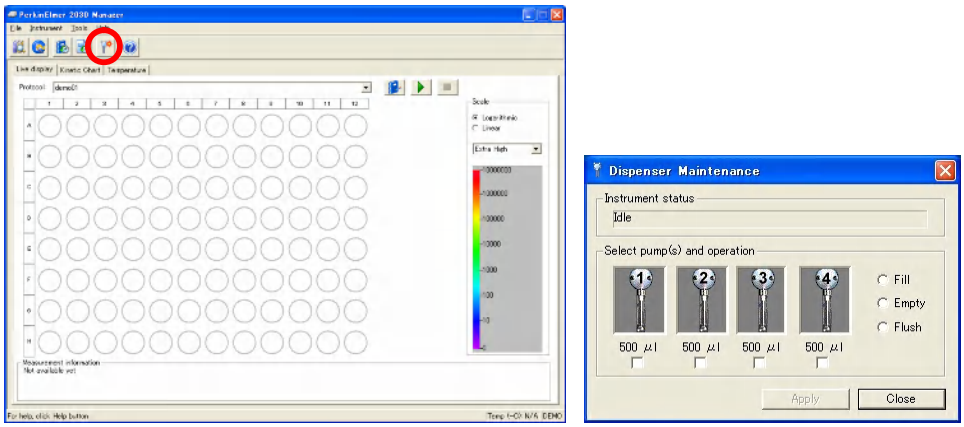


続いてウィンドウの下の方にあるチェックボックスにチェックを入れ、最後に File メニューから Save を選んでこの設定を保存し、“Protocol editor”を閉じてください。



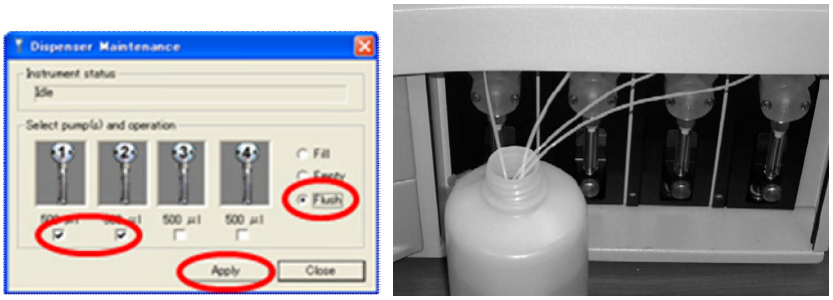
⑧ ディスペンサーの送液ライン洗浄と試薬の充填

PerkinElmer 2030 Manager ウィンドウにおいて、“Dispenser Maintenance”のアイコン をクリックし、Dispenser Maintenance のダイアログボックスを開いてください。



ダイアログボックスが開いたら、試薬分注に使用するディスペンサーのポンプのチェックボックスにチェックを入れ（シングルルシフェラーゼなら1箇所、デュアルルシフェラーゼなら2箇所）、同時に“Flush”を選択してください。送液ラインの末端を MilliQ 水に入れ、ポンプ稼働中にライン末端が MilliQ 水から出ないようにした状態で“Apply”をクリックし、送液ラインに MilliQ 水を送り込んでライン内部を洗浄してください。この操作は2回行ってください。

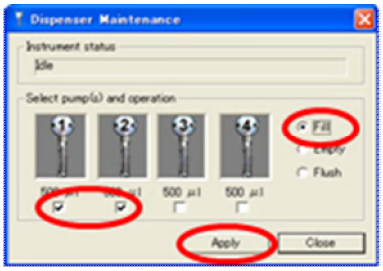
（MilliQ 水は、通常設定時（PrimingVolume が0.7mL の場合）には、ポンプ1つ・Flush 1回あたり、約2.1mL 以上必要です。）



MilliQ 水でのライン洗浄を終えたら、こんどは送液ラインの末端を MilliQ 水から出した状態で“Apply”をクリックし、ラインに空気を送り込んでライン内部の MilliQ 水を抜きます。

続いて“Fill”を選択してから送液ラインの末端を分注する各試薬の容器に入れ、ポンプ稼働中にライン末端が試薬溶液から出ないようにした状態で“Apply”をクリックし、送液ラインに試薬溶液を充填してください。この操作は1回だけ行ってください。

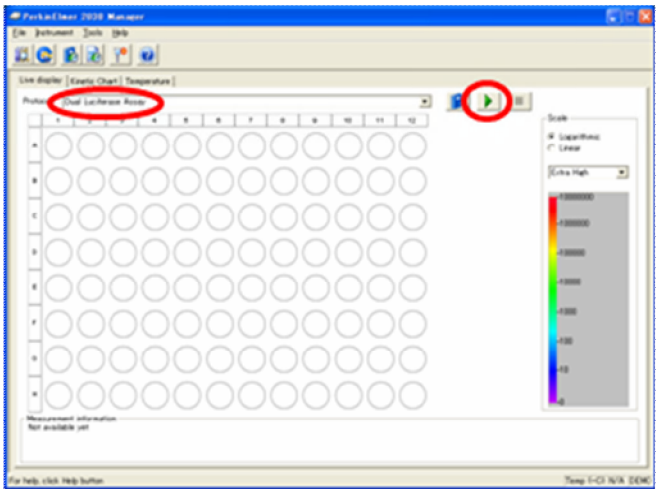
（試薬溶液は、通常設定時には、ルシフェラーゼアッセイに使用する容量+0.7mL 以上必要です。）



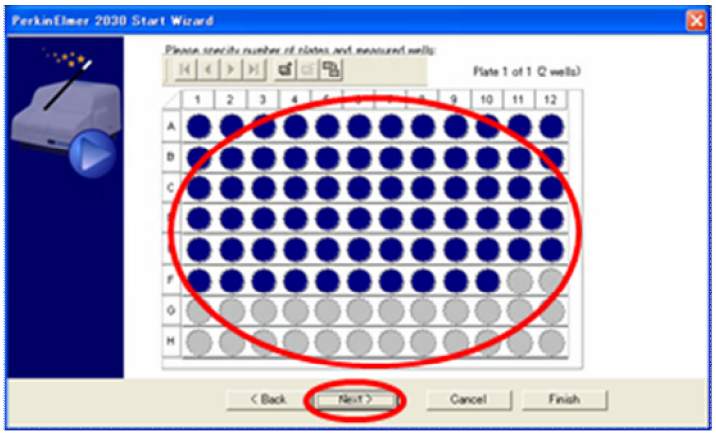
試薬溶液の充填を終えたら、ライン末端は試薬溶液に入った状態で“Close”をクリックし、Dispenser Maintenance ダイアログボックスを閉じてください。

⑨ ルシフェラーゼアッセイの実行

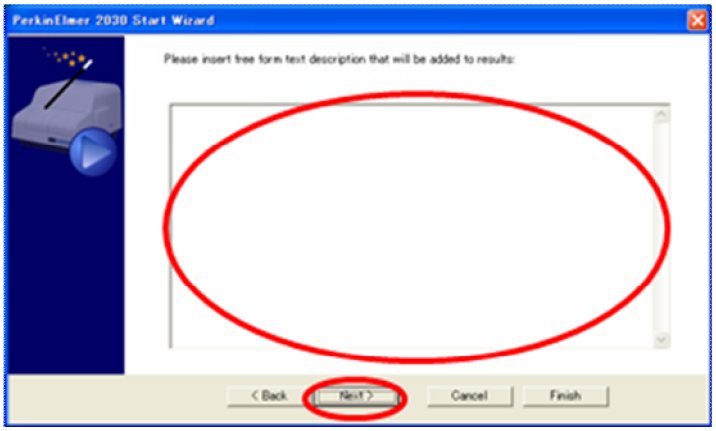
PerkinElmer 2030 Manager ウィンドウにおいて、目的のルシフェラーゼアッセイの測定プロトコールをドロップダウンメニューから選択し、スタートアイコン ▶ をクリックしてください。



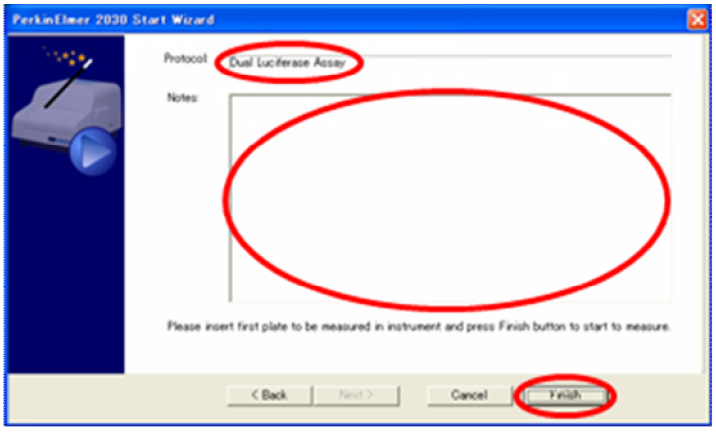
PerkinElmer 2030 Start Wizard ウィンドウが開くので、まず必要に応じたプレートマップの変更を行います。試薬分注を伴うアッセイですので、貴重な試薬を無駄にしないためにも、サンプルが入っていないウェルに対して試薬分注・測定を行わないように、正確に設定してください。プレートマップの変更を終えたら、“Next >”をクリックしてください。



次のウィンドウでは、アッセイに関する情報をメモ書きとして残す必要のある場合、それらを記述することができます。終了したら、“Next >”をクリックしてください。



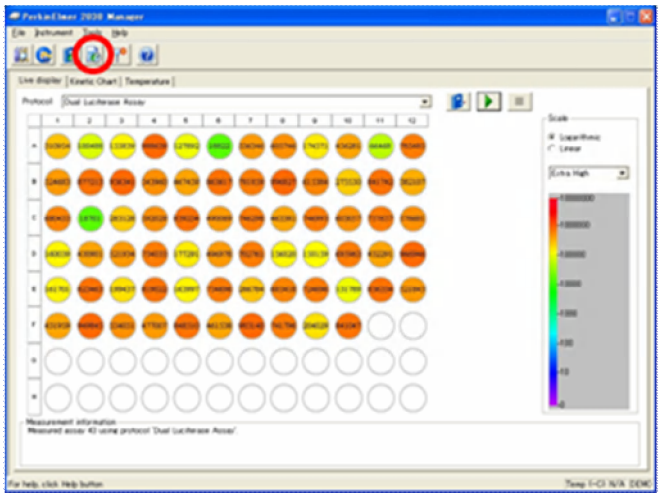
最後にプロトコール名やメモ書きの内容をご確認いただき、**ARVO にマイクロプレートをセットした後に**、**ディスペンサーのフタが閉じていることを確認した上で**、“Finish”をクリックすると、試薬分注を伴うルシフェラーゼアッセイの測定が始まります。



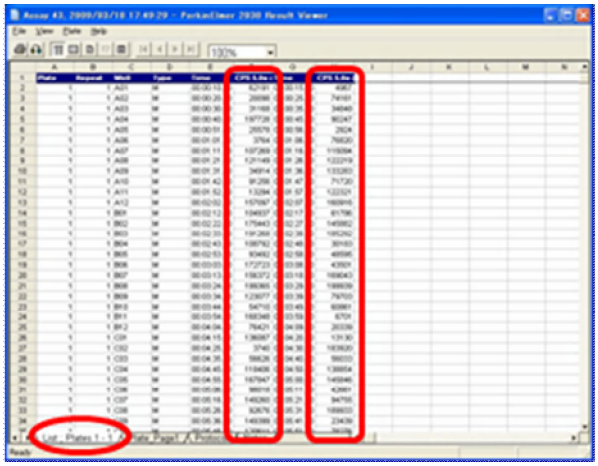
ディスペンサーによる自動分注作業を伴う、ルシフェラーゼアッセイが開始されます。測定中、スタートアイコンはアクティブではありません が、測定プロトコールの全行程を終えて終了すると、再びアクティブに なります。

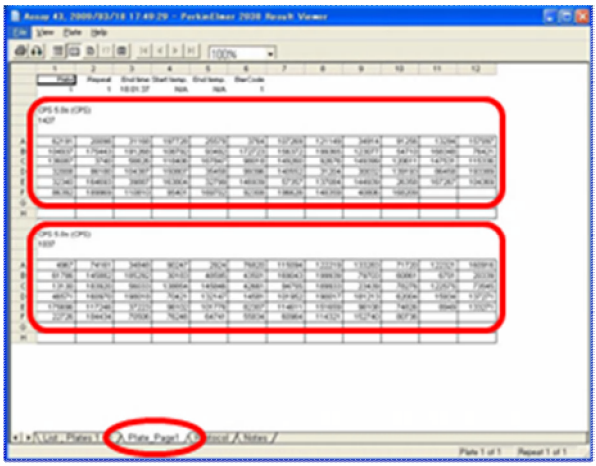
⑩ 測定データの取得

ルシフェラーゼアッセイ終了後、PerkinElmer 2030 Manager ウィンドウにおいて、“Latest assay result”のアイコン をクリックしてください。

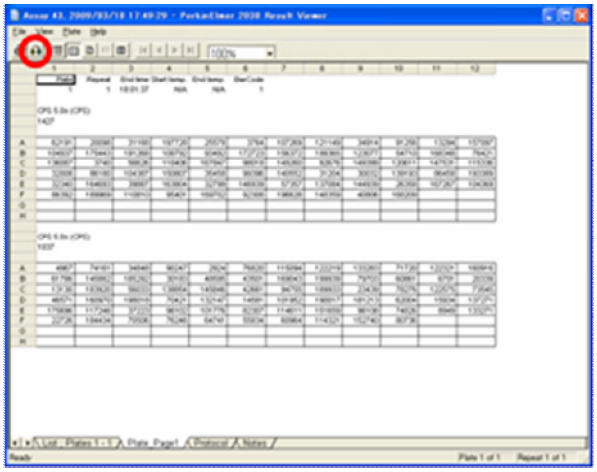


以下のように PerkinElmer 2030 Result Viewer ウィンドウが開き、リスト形式（左側）、プレート形式（右側）に見られるように、ルシフェラーゼアッセイ（下図の場合はデュアルルシフェラーゼアッセイ）の測定結果が表示されます。

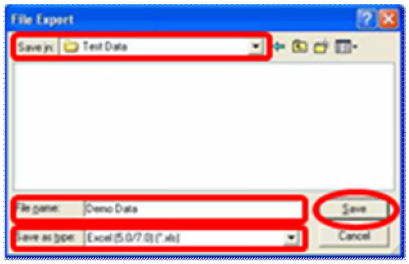




この測定結果をファイル出力する場合には、PerkinElmer 2030 Result Viewer ウィンドウ（リスト形式・プレート形式のいずれの画面でもかまいません）において、“Export”のアイコン をクリックしてください。



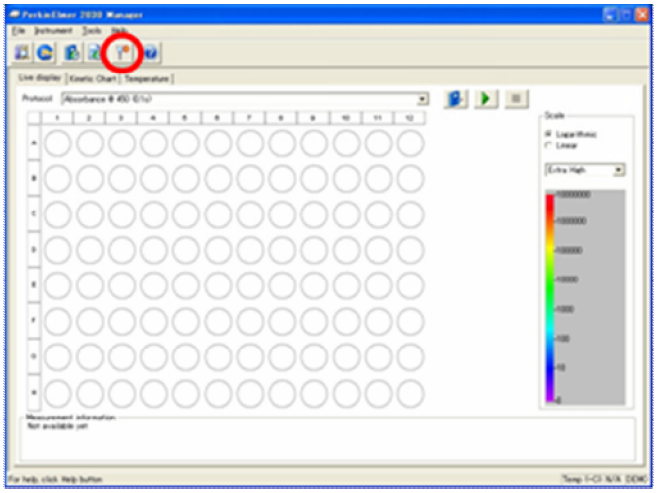
File Export のダイアログボックスが開きますので、保存先のディレクトリ・ファイル形式（デフォルトの Excel 形式がお勧めです）・ファイル名を指定し、最後に“Save”をクリックすると測定結果がファイルの形で出力されます。

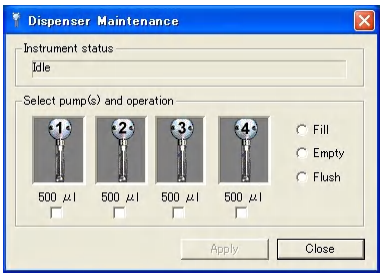


以上で測定データの取得は終了ですので、PerkinElmer 2030 Result Viewer ウィンドウを閉じてください。

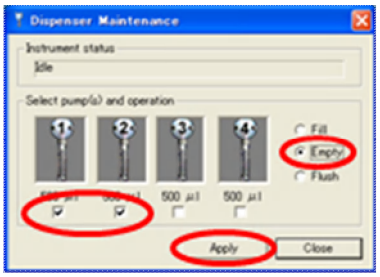
⑪ 試薬の回収とディスペンサーの送液ライン洗浄

PerkinElmer 2030 Manager ウィンドウにおいて、“Dispenser Maintenance”のアイコン をクリックし、Dispenser Maintenance のダイアログボックスを開いてください。





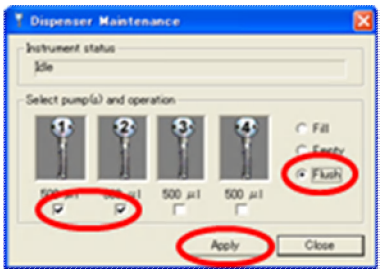
ダイアログボックスが開いたら、試薬分注に使用したディスペンサーのポンプのチェックボックスにチェックを入れ、未使用の試薬溶液を回収するために“Empty”を選択してください。

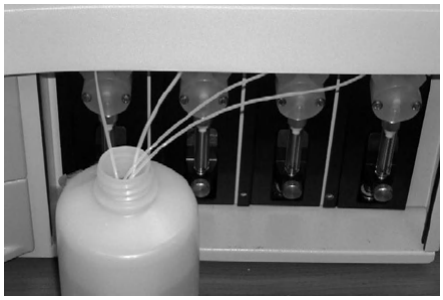


送液ラインの末端を試薬容器に入れた状態で“Apply”をクリックすると、ディスペンサーのポンプが逆に動作し、送液ライン中にあった未使用の試薬溶液が試薬容器へと回収されます。
（試薬溶液の回収は必須事項ではなく、送液ライン内部の試薬回収が不要な場合には、この行程をスキップしてください）

続いて“Flush”を選択してから送液ラインの末端を MilliQ 水に入れ、ポンプ稼働中にライン末端が MilliQ 水から出ないようにした状態で“Apply”をクリックし、送液ラインに MilliQ 水を送り込んでライン内部を洗浄してください。この操作は3回行ってください。

（MilliQ 水は、通常設定時（PrimingVolume が0.7mL の場合）には、ポンプ1つ・Flush 1回あたり、約2.1mL 以上必要です。）





MilliQ 水でのライン洗浄を終えたら、こんどは送液ラインの末端を 70%に希釈したエタノールに入れ、ポンプ稼働中にライン末端が 70%エタノールから出ないようにした状態で“Apply”をクリックし、送液ラインに 70%エタノールを送り込んでライン内部を洗浄してください。この操作は2回行ってください。

（70%エタノールは、通常設定時（PrimingVolume が0.7mL の場合）には、ポンプ1つ・Flush 1回あたり、約2.1mL 以上必要です。）

最後に送液ラインの末端を 70%エタノールから出した状態で“Apply”をクリックし、ラインに空気を送り込んでライン内部の 70%エタノールを抜きます。

これらを終了したら “Close”をクリックし、Dispenser Maintenance ダイアログボックスを閉じてください。

（送液ライン内部の洗浄に次亜塩素酸溶液を使用すると、分注ノズルが錆びてしまう恐れがありますので、次亜塩素酸溶液は絶対に使用しないでください）

送液ラインの洗浄を終えたら、ディスペンサー前部左側の引き出しをあけ、廃液タンクに溜まった廃液を適宜捨ててください。

⑫ ARVO 本体と PC / ソフトウェアの終了

ARVO システムの終了は、まず PC / ソフトウェアを終了し、続いて ARVO 本体の電源を Off にします。

まずコントロール用 PC にて起動しているソフトウェアをすべて終了します。ソフトウェアの終了に際しては、この順序で終了しなければならないという順序はありません。各ウィンドウ右上の×マークをクリックして、順次ソフトウェアを終了させてください。

続いて通常の手順でコントロール用 PC を終了させてください。

最後に ARVO の電源を切りますが、その際は分注装置右側背面にある電源スイッチを Offにしてください。

（ARVO 本体背面の電源スイッチには触らずに、常時 On にしておいて下さい。）